

令和 2 年 7 月 10 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07671

研究課題名(和文) Geobacter属細菌の細胞外電子伝達ネットワークの解明

研究課題名(英文) Extracellular electron transfer network in Geobacteraceae

研究代表者

井上 謙吾 (Inoue, Kengo)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：70581304

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：鉄還元菌・発電菌として代表的なGeobacter sulfurreducensの標準株PCA株は細胞外電子伝達には複数種のc型シトクロムを利用する。本研究では、それらc型シトクロム同士の相互作用について詳細を明らかにすることを目的とした。c型シトクロムのうち微生物燃料電池での発電に必須なOmcZを大量生産するG. sulfurreducensを作製し、OmcZを精製することに成功した。精製OmcZについて、シッティングドロップ法によって結晶化条件を検討したところ、赤色の結晶を形成する8条件が明らかになった。得られた結晶についてX線結晶構造解析を試みたところ、3.4 Åの反射データを収集した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微生物燃料電池は有機性廃棄物を処理すると同時に発電が可能な画期的な技術であり、今世紀に入って注目を浴びるようになった。微生物燃料電池は下水処理などですでに実用化されているが、Geobacter sulfurreducensは発電時に電極表面で数を増やし、中心的に発電を行う代表的な発電菌であり、さらにOmcZは本株が生産する発電に最も重要なタンパク質の一つである。本研究では、そのOmcZが相互作用を行うタンパク質、及び、その立体構造の解明を試みた研究であり、G. sulfurreducensの発電メカニズムが解明されれば、微生物燃料電池の性能向上に向けた基礎的知見を明らかにすることができる。

研究成果の概要(英文)：Geobacter sulfurreducens has been historically studied as iron- and electrode-reducing microorganism. G. sulfurreducens can transfer electrons from inside the cell to outside via various c-type cytochromes. Among the c-type cytochromes, OmcZ is essential for electron transfer to the electrode. In this study, OmcZ-overexpressing G. sulfurreducens was generated and OmcZ was purified by affinity chromatography by FPLC. Purified OmcZ was crystallized by sitting drop method. X-ray diffraction data at 3.4 angstrom were obtained.

研究分野：応用微生物学

キーワード：鉄還元菌 Geobacter 細胞外電子伝達 シトクロムc

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

鉄還元細菌は嫌気条件下で有機化合物を代謝する過程で生じる電子を細胞外に存在する不溶性の酸化鉄(Ⅲ)に伝達することができる(「異化的鉄還元」と呼ばれる)。地球全体の組成において鉄は最も存在量の多い元素であるため、鉄還元菌は自然界の鉄の物質循環において極めて重要な役割を担っている。近年では、鉄還元菌が微生物燃料電池において電極へ直接電子伝達を行う「発電菌」として精力的に研究が行われている。*Geobacter* 属、および *Shewanella* 属細菌は、鉄還元細菌として研究されてきた代表的な菌種であり、これらの鉄還元菌は、異化的鉄還元を行うために細胞膜周辺に特殊な分子機構を持つ。これまでの知見によると、鉄還元菌では、細胞膜(内膜と外膜)およびペリプラズムの至るところに *c* 型シトクロムが局在し、細胞内から細胞外への電子伝達を担うこと、線毛(pili)により構成される電気伝導性ナノワイヤーを生産し、細胞外への電子伝達に利用することなどが知られている。*Geobacter sulfurreducens* は鉄還元菌の中でも古くから研究されてきた経緯もあり、多くの知見が蓄積している。*G. sulfurreducens* の標準株 PCA 株では、不溶性の酸化鉄(Ⅲ)の還元には *omcB*、*omcE*、*omcS* が必須であること、微生物燃料電池内での電極への電子伝達には *omcZ* が必須であることが明らかになっている。また、OmcB が細胞外膜に局在すること、OmcS が電気伝導性ナノワイヤーに沿って局在すること、OmcZ は微生物燃料電池の電極表面に局在することが知られている。OmcB、OmcE、OmcS、OmcZ はそれぞれ 12、4、6、8 個のヘム *c* を補因子として分子内に保持する、マルチヘムシトクロムである。

2. 研究の目的

これらのマルチヘムシトクロムが細胞外電子伝達に重要な役割を果たすことは、それぞれの破壊株の解析などから明らかにされてきた。しかし、ペリプラズムから伝達してきた電子が細胞外電子受容体(最終電子受容体;不溶性酸化鉄や電極など)へ伝わるための電子の流れについては未だ未解明である。少なくとも、これら細胞外電子伝達のキープレイヤーそれぞれが相互作用し得るのか、また、電子の授受が行われ得るのか、といった情報は現在のところ皆無である。そこで、本研究ではこれらのシトクロム間の電子伝達ネットワーク全容を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

目的のシトクロムを過剰発現する *G. sulfurreducens* 組み換え体を作製し、菌体破碎後、FPLC を用いたアフィニティークロマトグラフィーとそれに続くゲルろ過クロマトグラフィーによってタンパク質を精製する。Dynabeads Co-Immunoprecipitation kit と抗 OmcZ 抗体を用いて、OmcZ と相互作用するタンパク質サンプルを調製し、SDS-PAGE とそれに続くヘム染色を行うことでそのプロファイルを明らかにした。また、精製したシトクロムタンパク質についてはそれぞれ結晶化条件を検討し、良好な結晶が得られた場合には X 線結晶構造解析を試みた。

4. 研究成果

<共免疫沈殿法によるシトクロムの相互作用解析> *Geobacter sulfurreducens* の標準株 PCA 株が持つ *c* 型シトクロム同士の相互作用について詳細を明らかにするため、微生物燃料電池で発電に必須なシトクロムである OmcZ を抗原として作製された抗 OmcZ 抗体を用いて共免疫沈殿を行った。共免疫沈殿によって得られた OmcZ と相互作用する可能性のあるタンパク質を取得することに成功した。SDS-PAGE に供したところ、複数のバンドが見られたことから、分子量

の異なる複数種のタンパク質が OmcZ と相互作用を行うことが推察された。SDS-PAGE のバンドをゲルから切り出し、OmcZ と相互作用すると考えられたタンパク質について同定を試みたが、得られたタンパク質量が少なく、同定には至らなかった。今後同様の実験を複数回行い、OmcZ と相互作用するタンパク質を十分量確保してから同定を試みる。< c 型シトクロムの結晶構造解析 > OmcZ の結晶構造解析については、OmcZ の C 末端側に His タグを付加した OmcZ を *G. sulfurreducens* 内で大量生産させ、HisTrap を用いた精製を行った。精製した OmcZ を SDS-PAGE に供したところ、単一のバンドとして検出される程度に十分に精製されていたため、結晶化条件を検討した。シットティングドロップ方により、1,152 条件を試験したところ、少なくとも 8 条件で赤色結晶の形成が確認できた (OmcZ はヘム鉄を持つため赤色)。明らかになった結晶化条件についてさらに pH や塩濃度、沈殿剤濃度などを振って複数の良好な結晶を得ることに成功した。結晶を X 線結晶構造解析に供したところ、3.4 Å の反射データを収集した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 内田健裕、甲斐絢子、井上謙吾
2. 発表標題 微生物燃料電池の発電に必須なc型シトクロムの精製及び生化学的特徴付け
3. 学会等名 日本生物工学会九州支部会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 甲斐絢子、徳石崇宏、河野好裕、榊原陽一、水光正仁、井上謙吾
2. 発表標題 微生物燃料電池の発電に必須なシトクロムの成熟メカニズムに関する研究
3. 学会等名 日本生物工学会九州支部会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考